

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591535

研究課題名（和文） Ldb2 (Disc-M) ノックアウトマウスの表現型と統合失調症の病理解明への応用

研究課題名（英文） Analysis of Disc-M KO mice to reveal the pathogenesis of schizophrenia

研究代表者

大西 哲生 (OHNISHI TETSUO)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・研究員

研究者番号：80373281

研究成果の概要（和文）：

本研究では、以前我々が同定・報告した染色体転座を伴う統合失調症一症例にみられる4番染色体側切断点付近に存在する DISC-M 遺伝子に着目し、その対応遺伝子のノックアウトマウスの表現型を解析した。Disc-M ノックアウトマウスは、平時過活動、NMDA 受容体アンタゴニスト過感受性、ドパミン作動薬過感受性など統合失調症モデルマウスにおいて頻繁に報告されている表現型を示した。一部の認知学習課題（音恐怖条件付け）において顕著な障害を認めた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have focused on the schizophrenia-relevant gene *DISC1*, which is disrupted by a chromosomal break seen in a Japanese schizophrenic patient. Because the function of this gene remains totally unknown, we first set out to examine the phenotype of *Disc-M* KO mice. The KO mice exhibited multiple deficits relevant to schizophrenia: hyperactivity in the drug-naïve mice, hypersensitivity to NMDA antagonist and DA agonist. Interestingly, cued fear conditioning was totally damaged by disruption of the *Disc-M* gene. These data may reflect that disruption of the gene by the chromosomal break this gene is really pathogenic at least in the proband.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、ノックアウトマウス、行動実験、DISC1、転写因子

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病因は、多くの研究者による長年の努力にもかかわらず、現在でも不明のままである。しかしながら、遺伝的素因が発症に強い影響を与えることに関してはコンセンサスが得られており、具体的な遺伝子の同定を目指して激しい競争が行われてきた。その結果、次第に、一般の統合失調症においては比較的少数の遺伝子が発症に強い影響を及ぼす可能性は否定され(RVCD)、弱い遺伝学的・生物学的効果しかもたない、極めて多くの遺伝子とそのありふれた多型により発症リスクが決定される可能性 (CVCD: common variant common disease 仮説) が次第に明らかになってきた。しかしながら、このことは統合失調症の生物学的基盤を明らかにする上で、解決困難な課題を抱えることにもなった。

2. 研究の目的

そこで我々は、ごく稀にしか存在しないものの、発症に強い影響を与える可能性がある染色体異常症例に着目することとした。この症例は 2004 年に我々がすでに報告していたものであり

(Itokawa et al. *Psychiatry Clin Neurosci* 58,333,2004)、4 番染色体と 13 番染色体の間で均衡型相互転座を認める男性統合失調症患者であった。本変異は両親には存在せず、*de novo* 変異であり、また家族内に精神疾患は集積していなかったことから、本転座が発端者の原因になったのかどうかについては不明であった。その後の解析により、13 番側

の切断点はいわゆる遺伝子砂漠であり、染色体切断により直接影響される遺伝子はないものと考えられたが、4 番染色体側切断点近傍には、殆ど解析されてこなかった転写調節因子をコードすると考えられる *DISC-M* (Disrupted-In-Schizophrenia, Matsuzawa) が存在することが判明した。

3. 研究の方法

しかしながら本染色体転座や、*DISC-M* の破壊が統合失調症発症につながったのかどうかについて直接の証拠は全く存在しなかった。そこで、この問題を解決する一助として、*Disc-M* ノックアウトマウスの表現型を調べることにした。本遺伝子のノックアウトマウスは、すでに販売されていたものを購入し、バッククロスにより遺伝的背景を C57BL/6N 系統に近づけたのち、ヘテロ接合体の兄妹交配によりノックアウトマウス (homozygote) と対照群として用いる同腹野生型産児を獲得した。産児を生後 3-4 週で離乳させ、13 週以降各種行動実験を行った。また、定量的 RT-PCR 法あるいは我々が独自に開発した *Disc-M*/*DISC-M* 抗体によるウエスタンブロット法により、ノックアウトマウスでは本遺伝子の発現が完全に消失していることをあらかじめ確認した。

4. 研究成果

我々が独自に開発した抗 *Disc-M* タンパク質モノクローナル抗体によるウエスタンブロット法や免疫組織学的分析により、*Disc-M* は各種組織の中でも脳に特に強く発現して

おり、そのなかでも大脳皮質 (Layer4 を除く)、扁桃体、海馬 CA1 領域に強い発現を認めた。その一方で、嗅球、線条体、小脳、海馬歯状回など全く発現が見られない部位も存在するという、特徴的な発現パターンが認められた。次ぎに、統合失調症関連、情動関連、一般運動試験等からなる行動テストバッテリーでノックアウトマウスを評価した。その結果、*Disc-M*ノックアウトマウスは、野生型対照マウスと比較すると、明期暗期両相における過活動性、オープンフィールド試験による過活動性、MK-801 (NMDA 受容体アンタゴニスト)やメチルフェニデート (ドパミン作動薬)に対する過剰な行動感作等、統合失調症モデル動物の多くで共通して認められる異常を呈した。また、統合失調症の中間表現型として汎用されているプレパルス抑制 (prepulse inhibition ; PPI) の減弱は認められなかったが、MK-801 をあらかじめ腹腔内しておくと、野生型と比較して、PPI は顕著に抑制され、この点においてもグルタミン酸系の過感受性が明らかになった。また統合失調症患者には認知関連症状も頻繁に現れるが、*Disc-M*ノックアウトマウスにも、音恐怖条件付けが全く不能であるという極めて明確な認知学習課題の異常も認められた。これらの異常は、本遺伝子が統合失調症関連遺伝子であることを強く示唆するものであり、転写調節遺伝子としての本遺伝子の産物がどのような遺伝子ネットワークを制御しうるのかを知ることは重要であることから、海馬、前頭葉の網羅的転写物解析 (マイクロアレイ実験) を施行し、*Disc-M*遺伝子産物の下流で数百の遺伝子発現の変動を認めた。それらの中には、今まで統合失調症との遺伝統計学的、生物学的関連が示唆されてきたものも複数存在した。また、甲状腺ホルモントランスポーター、葉酸トランスポーターなどホルモン、ビタミン

ンなどの脂溶性メディエーターのトランスポーターなどは特に大きく変動していた。また WGCNA (weighed gene correlation network) 解析において、多くの遺伝子間の発現相関が、ノックアウトマウスにおいて破壊されていることが分かった。

マウスを用いたこれらの解析の結果から、*DISC-M*遺伝子は、ごく稀ではあるものの、その遺伝子が破壊されると、統合失調症の発症に強い影響を与えうること、そのメカニズムとしては、転写制御の異常が考えられることが判明した。

このような、ごく稀ではあるが強い遺伝的効果を持つ変異 (特に染色体異常) に着目して、その原因遺伝子の単離から、その生物学的機能の解明につなげた例としては、スコットランドの精神疾患多発家系において同定された *DISCI* 遺伝子の例があるが、今後 *DISCI*, *DISC-M* に続く例を収集、解析することで (「強調された表現型」の発見)、次第に一般の統合失調症の病態生理、発症リスク形成メカニズム等の理解が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Ablation of *Mrds1*/*Ofcc1* induces hyper- γ -glutamyl transpeptidaseemia without abnormal head development and schizophrenia-relevant behaviors in mice. Ohnishi T, Yamada K, Watanabe A, Ohba H, Sakaguchi T, Honma Y, Iwayama Y, Toyota T, Maekawa M, Watanabe K, Detera-Wadleigh SD, Wakana S, Yoshikawa T. PLoS One. 2011;6(12):e29499. Epub 2011 Dec 29. (査読有)

②Analysis of strain-dependent prepulse inhibition points to a role for Shmt1 (SHMT1) in mice and in schizophrenia. Maekawa M, Ohnishi T, Hashimoto K, Watanabe A, Iwayama Y, Ohba H, Hattori E, Yamada K, Yoshikawa T. J Neurochem. 2010 Dec;115(6):1374-85 (査読有)

③Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M, Ichikawa T, Nishida A, Tanaka Y, Furukawa A, Aikawa Y, Kuroda O, Niizato K, Izawa R, Nakamura K, Mori N, Matsuzawa D, Hashimoto K, Iyo M, Sora I, Matsushita M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Miyata T, Itokawa M. Arch Gen Psychiatry. 2010 Jun;67(6):589-97. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

①Ohnishi T, Watanabe A, M. Arai, Itokawa M, Yoshikawa T *et al.* Mice deficient in a gene encoding a transcriptional regulator exhibit multiple behavioral deficits reminiscent of schizophrenia, 66th Annual Meeting, Society for Biological Psychiatry, San Francisco, USA, May 14,2011.

[図書] (計 1 件)

大西哲生、吉川武男「第三章脳神経系：精神疾患」、分担「疾患も出るマウス表現型解析指南」(編)山村研一、若菜茂春、pp76-83、中山書店、2011年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 哲生 (OHNISHI TETSUO)
独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・研究員
研究者番号：80373281

(2) 研究分担者

吉川 武男 (YOSHIKAWA TAKEO)
独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・チームリーダー
研究者番号：30249958

(3) 連携研究者

糸川 昌成 (ITOKAWA MASANARI)
(財) 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員
研究者番号：40332324

新井 誠 (ARAI MAKOTO)

(財) 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員
研究者番号：80356253